

Title	Studies on the Hepatocellular Attachment and Entry of HBV Envelope-derived Bio-nanocapsule and Its Liposome Complex
Author(s)	山田, 光男
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59350">https://hdl.handle.net/11094/59350</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">こちら</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【91】

氏 名	やま だ みつ お 山 田 光 男
博士の専攻分野の名称	博 士（理学）
学 位 記 番 号	第 2 5 4 5 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	Studies on the Hepatocellular Attachment and Entry of HBV Envelope-derived Bio-nanocapsule and Its Liposome Complex ( B型肝炎ウイルス外皮タンパク質由来バイオナノカプセルおよびその リボソーム複合体の肝細胞への結合様式および侵入機構に関する研究 )
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷澤 克行 (副査) 教 授 小倉 明彦 教 授 平岡 泰 教 授 吉森 保

論 文 内 容 の 要 旨

Bio-nanocapsule (BNC) は、B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus, HBV) のヒト肝臓細胞特異的感染に必須な外皮Lタンパク質を出芽酵母で発現させることにより得られる中空ナノ粒子である。エレクトロポレーションによりBNC内部に遺伝子をはじめとする種々の物質を封入することが可能であり、培養細胞 (*in vitro*) 及び担癌マウス (*in vivo*) においてヒト肝臓細胞特異的に高効率で物質を送達できる。最近、BNCに細胞膜融合能が見いだされ、エレクトロポレーションでは封入が困難な物質を包含したリボソーム (Liposome, LP) とBNCが自発的に融合して得られるBNC-LP複合体は、BNCと同様にヒト肝臓細胞特異的に高効率で物質を送達できることが示された。また、同複合体を用いる方法はエレクトロポレーションを使用しない点で、医療応用面からもBNCより有望である。さらに、BNC表面のヒト肝臓認識部位を種々の生体認識分子 (抗体、糖鎖、レクチン等) に変換することで、標的細胞

胞に対する特異性をヒト肝臓細胞から任意の細胞に変更することが可能である。以上から、BNC及びBNC-LP複合体はナノメディシンを支える中核技術になると期待されている。しかし、これらを医薬品として開発するためには、標的細胞及び組織への薬物送達効率の最適化を行う必要がある一方で、BNC及びBNC-LP複合体のヒト肝臓細胞への結合様式及び細胞内侵入経路に関しては、HBVの初期感染機構に基づくと推定されているだけで、詳細な機構は未解明に残されている。そこで本研究では、BNC及びBNC-LP複合体のヒト肝臓由来細胞株表面への結合様式及び細胞内侵入経路の解析を行った。その際、入手も取り扱いも困難なHBVそのものの代わりに、HBVと類似する表面分子を有するB型肝炎患者血漿由来サブウイルス粒子（HBsAg）を陽性対照として使用した。まず、蛍光標識したBNCとHBsAgを各種細胞と接触させたところ、両粒子はヒト肝臓由来細胞株に対し特異的に結合した。また、その結合には、低pH・高塩濃度緩衝液による洗浄で区別できる‘細胞膜への緩い結合’と‘細胞膜への強い結合’の2種類の様式があることが判明した。これは、HBVの初期感染機構に関して提案されている‘細胞表層へパリンが関与する低親和性結合’及び‘未同定HBV受容体が関与する高親和性結合’のそれぞれに対応すると考えられた。さらに、BNCとHBsAgのヒト肝臓細胞内部への侵入速度を比較したところ、両者間に大きな差はなく、しかも、報告されているHBVのヒト肝臓細胞への侵入速度と同程度であることが判明した。次いで、BNC及びHBsAgのヒト肝臓細胞内への侵入経路並びに細胞内局在部位を解析したところ、両粒子はマクロピノサイトーシス及びクラスリン依存のエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、マクロピノソーム及び初期エンドソームを経て、後期エンドソーム/リソソームに移行することが判明した。以上の結果から、BNC及びHBsAgは、HBVと同様の機構でヒト肝臓細胞特異的に結合し、細胞内に侵入すると推定された。一方、2重蛍光標識したLPを用いるFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）解析により、BNCはpH依存的な膜融合活性・凝集活性をもつことを見出し、この活性によりBNC-LP複合体が形成されることを明らかにした。さらに、ヒト肝臓由来細胞株を用いてBNC-LP複合体の細胞結合様式、細胞内侵入速度、細胞内侵入経路を解析したところ、BNCと同様の挙動を示すとともに、細胞内ではBNC-LP複合体はBNCとLPに解離することが示唆された。以上、本研究により、BNC-LP複合体はBNC及びHBsAgと同様に、HBVの初期感染機構に従って、ヒト肝臓細胞表面に高い親和性で結合し、高効率で細胞内に取り込まれることが強く示唆された。BNC-LP複合体は、今後ヒト肝臓特異的なナノメディシンの創製において、薬物及び遺伝子送達用キャリアとして非常に有用であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は本論文に於いて、B型肝炎ウイルス（HBV）のヒト肝細胞特異的な感染に必要な外被Lタンパク質を構成成分とする中空ナノ粒子（Bio-nanocapsule: BNC）の肝細胞への侵入機構の解析を行った。BNCには任意の物質を封入できるため、ヒト肝細胞への物質送達に有用である。申請者は、まずBNCがウイルスと類似したカイネティクスにより細胞に侵入すること、侵入はマクロピノサイトーシスとクラスリン依存性エンドサイトーシスによること、取り込まれたBNCは初期エンドソーム、マクロピノソームを経てリソソームに蓄積することを示した。さらに、より物質送達能力の高いBNCとリポソーム(LP)の複合体（BNC-LP）について、低pHで形成が促進されること、BNCとLPの膜間でヘミフュージョンが起こっていること、細胞に侵入後両者が分離することなどを見出した。

以上、本論文は、未解明に残されているHBV感染の初期過程に関する知見を与えたばかりでなく、バイオナノカプセルを用いた肝細胞特異的な物質送達法の臨床応用にも大きく貢献するものである。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。